

Dispositif d'incubation pour lames de sérologie et d'histologie

La présente demande concerne un dispositif d'incubation pour supports de
5 sérologie ou d'histologie. Elle concerne également tout appareil comprenant un tel
dispositif, ainsi que l'utilisation de ces appareils et/ou dispositifs dans des procédés
d'analyse ou de diagnostic.

Arrière Plan de l'Invention

10

De nombreux tests de diagnostic sont basés sur la réaction en phase
hétérogène, entre une surface plane et solide (typiquement une lame porte-objet de
microscopie) et une phase liquide.

Dans une première variante (telle que par exemple les tests sérologiques),
15 l'échantillon biologique à tester est contenu dans la phase liquide, et réagit avec
une lame portant des éléments réactifs, par exemple des protéines, cellules,
séquences d'ADN, bactéries, virus, etc., déposés au préalable sur la lame. Après
une première réaction, la lame est mise en contact avec un réactif révélateur.

Selon une autre variante, l'échantillon biologique à tester est déposé sur la
20 lame, les éléments réactifs (anticorps, sondes d'ADN ou d'ARN, etc.) et révélateurs
étant alors dans la phase liquide. C'est le cas par exemple des tests histologiques
où l'échantillon est une coupe de tissu(s) provenant de l'organisme d'un patient.

Aujourd'hui, ces différentes opérations de manipulation de la phase solide
25 et de la phase liquide sont essentiellement manuelles. Certains réactifs sont
directement déposés sur la lame ou, dans le mode sérologique, c'est l'échantillon
biologique lui-même, puis la ou les lames sont trempées dans des bains successifs
qui réalisent les opérations de coloration nécessaires à l'observation. Il en résulte
différents inconvénients, et notamment :

30 - un risque de fausse manipulation lorsque un échantillon de quelques
microlitres est déposé sur une lame et peut glisser en dehors de la zone réactive,

- un manque de reproductibilité car il est impossible de contrôler précisément les forces de cisaillement auxquelles est soumis le dépôt sur la lame,
- une dérive des réactifs, qui, pour des raisons de coût, ne sont pas renouvelés à chaque trempage.

5

Les appareils disponibles actuellement traitent les lames de manière ouverte, avec des jets de liquide ou des bains, entraînant des consommations élevées de réactif ainsi qu'un risque élevé de contamination. Ils ne sont pas adaptés à une utilisation à accès aléatoire, qui est seule capable de répondre à l'urgence. Tels sont par exemple les appareils décrits dans les brevets ou demandes de brevets n° WO03/052386, US6,352,861 et US6,495,106 de LabVision, Ventana et BioGenex. Ils sont adaptés à l'immunohistologie et ne sont pas utilisés en sérologie.

15 Il existe donc un besoin réel de dispositifs d'incubation améliorés pour lames de sérologie ou d'histologie, permettant une analyse rapide, fiable et automatisée. Dans le domaine sérologique il y a en particulier un besoin non satisfait d'incubateur de lame à accès aléatoire, qui puisse traiter une lame dans des délais courts (typiquement en moins d'une heure), et répondre aux diagnostics d'urgence en matière de maladies infectieuses. La présente invention apporte une solution à ces besoins.

Résumé de l'Invention

25 La présente demande concerne un nouveau dispositif d'incubation pour lames de sérologie ou d'histologie. Elle concerne également tout appareil comprenant un tel dispositif, ainsi que l'utilisation de ces appareils et/ou dispositifs dans des procédés d'analyse ou de diagnostic.

30 L'objet de la présente invention est notamment de fournir un dispositif d'incubation pour lames de sérologie ou d'histologie qui évite les inconvénients

mentionnés précédemment, en assurant la mise en contact des éléments réactifs de manière fiable et automatique.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans un
5 dispositif d'incubation de lames de sérologie ou d'histologie présentant une zone réactive, caractérisé en ce que:

- il comprend un support solide (1) ayant une surface plane sur sa face supérieure, dans lequel est aménagé au moins un alvéole (2) ouvert sur la surface du support, l'ouverture ayant une superficie supérieure à celle de la zone réactive
10 de la lame et inférieure à celle de la surface de la lame,
 - le fond de l'alvéole comprend au moins deux orifices (4) permettant la circulation de fluide(s) dans l'alvéole,
 - le contour de l'ouverture de l'alvéole est avantageusement muni d'un moyen permettant d'assurer une étanchéité, de préférence d'un joint (5); et
- 15 - le dispositif comporte en outre des moyens pour disposer et/ou bloquer une lame (6) de sérologie ou d'histologie de manière à ce que la zone réactive de la lame se trouve en face de l'ouverture de l'alvéole à la surface du support, la lame et le support coopérant ainsi pour former une chambre d'incubation étanche.

20 Dans des modes de réalisation particulièrement préférés de l'invention:

- le dispositif comporte en outre des moyens pour assurer une alimentation en fluide(s) de l'alvéole (ou de la chambre d'incubation), et/ou
 - le support comporte une pluralité d'alvéoles tels que définis précédemment, permettant l'incubation en parallèle de plusieurs échantillons,
25 disposés sur une même lame ou sur des lames distinctes, et/ou
 - le dispositif comporte en outre des moyens d'alimentation automatique de lames et, éventuellement, un lecteur d'identifiant de lames, et/ou
 - le dispositif comporte en outre des moyens de transfert de lame vers un dispositif de lecture de signal, et/ou
- 30 - le fond de l'alvéole comprend trois orifices, un pour la sortie des fluides, un pour l'entrée des liquides et un pour l'entrée des gaz.

D'une manière particulièrement avantageuse, dans le dispositif de l'invention, la lame porte-objet (6) constitue la face supérieure démontable d'une chambre d'incubation, ladite chambre étant étanche et munie d'orifices (4) permettant la circulation des différents fluides nécessaires au développement de réactions de sérologie ou d'histologie. Ainsi notamment, selon l'invention :

- la mise en place de l'échantillon (en mode sérologique) ou des réactifs (en mode histologique) ne se fait pas sur la lame mais directement dans le dispositif à un emplacement prévu à cet effet,
- les réactifs successifs sont mis en contact avec la lame par un balayage laminaire limitant strictement le cisaillement,
- les opérations se succèdent "à réactif perdu", après chaque réaction le réactif utilisé (ou l'excès du réactif) est évacué, et n'est pas réutilisé.

Ces caractéristiques sont particulièrement avantageuses et permettent la mise en contact des éléments réactifs de manière fiable et automatique, et de fournir des résultats reproductibles.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'analyse sérologique comprenant l'incubation d'une lame de sérologie comprenant une zone réactive comportant une série de dépôts d'agents infectieux, pathogènes, allergènes ou autoantigènes avec un échantillon de sérum d'un patient, ou une dilution de celui-ci, puis la révélation des anticorps de l'échantillon fixés sur les dépôts au moyen de réactifs marqués, caractérisé en ce que l'incubation est réalisée dans un dispositif tel que défini précédemment. L'échantillon à tester peut être introduit dans un alvéole avant la mise en place de la lame, puis la lame est appliquée sur la surface du support de manière à former la chambre d'incubation étanche dans laquelle la zone réactive de la lame est au contact de l'échantillon. En variante, l'échantillon à tester peut être introduit (pompé) dans la chambre d'incubation formée par la lame mise en place sur l'alvéole.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'analyse histologique comprenant l'incubation d'une lame d'histologie comprenant une zone réactive comportant un échantillon de tissu d'un patient avec une solution d'anticorps spécifiques, puis la révélation des anticorps de la solution fixés sur l'échantillon au moyen de réactifs marqués, caractérisé en ce que l'incubation est réalisée dans un dispositif tel que défini précédemment.

L'invention concerne également l'utilisation d'un dispositif tel que défini précédemment pour l'analyse sérologique ou histologique.

10

Un autre aspect de l'invention concerne des kits, notamment d'analyse biologique, comprenant un dispositif tel que défini précédemment.

L'invention est applicable dans de nombreux domaines, notamment pour l'analyse histologique ou sérologique dans un contexte médical, vétérinaire, environnemental, agro-alimentaire, etc.

Description détaillée de l'invention

Comme indiqué précédemment, l'invention porte sur un dispositif adapté à l'analyse de lames de sérologie ou d'histologie. Le dispositif comporte avantageusement un support solide (1) ayant une surface plane sur sa face supérieure dans lequel est aménagé au moins un alvéole (2) ouvert sur la surface du support, le support coopérant avec la surface de la lame pour former, au niveau de l'alvéole, une chambre d'incubation étanche dont la lame représente la face supérieure amovible, le fond (c'est-à-dire l'ensemble de la paroi constituant l'alvéole) de l'alvéole comprenant par ailleurs au moins deux orifices (4) permettant la circulation de fluide(s) (liquides, gaz) dans la chambre d'incubation ainsi formée.

30

Le support utilisé peut être de formes et de dimensions variées, dans la mesure où il comporte une surface plane, de préférence sur la face supérieure. Le support est typiquement de forme rectangulaire, adaptée à la forme habituelle des lames de sérologie ou d'histologie, même si toute autre forme peut être envisagée (carrée, circulaire, triangulaire, etc.). Ainsi, lorsque le positionnement de la lame est assuré par le couvercle, le support de l'alvéole peut être de taille limitée au contour de la surface assurant l'étanchéité, typiquement un joint limitant l'alvéole. L'épaisseur du support doit être suffisante pour permettre de recevoir l'alvéole (une cavité), d'un volume approprié pour former une chambre d'incubation. Typiquement, la chambre d'incubation (et donc l'alvéole) possède un volume compris entre 5 et 500 μ l, par exemple entre 10 et 350 μ l, et le support devrait présenter une épaisseur supérieure à 3 mm, par exemple comprise entre 0,5 et 3 cm.

Le support solide peut être réalisé à partir de matériaux variés, éventuellement mélangés. Il peut en particulier être composé (ou à base de) de matériau plastique, de métal et/ou de tout matériau rigide résistant aux solutions salines et à des températures supérieures ou égales à 37°C. Dans un mode de mise en œuvre préféré, le support solide est composé (ou à base, c'est-à-dire comprend) de polyméthacrylate, de polyester, de polycarbonate, de nylon (delrin, rilsan) ou d'acier inoxydable, seuls ou en mélanges.

L'alvéole ménagé dans le support peut adopter différentes formes, selon les applications envisagées et/ou selon le type de support mis en œuvre. A priori, il n'existe pas de contrainte spécifique quant à la forme de l'alvéole, sous réserve que l'ouverture ait une superficie supérieure à celle de la zone réactive de la lame et inférieure à celle de la surface de la lame, pour permettre la formation de la chambre d'incubation. Par ailleurs, comme décrit dans la suite du texte, le support peut comprendre une pluralité d'alvéoles, permettant l'analyse séparée de plusieurs échantillons. Dans des variantes préférées de mise en œuvre, l'alvéole (et son ouverture) présente une forme circulaire ou allongée, avec des rayons de courbure

les plus grands possibles. Il est entendu que d'autres formes peuvent être envisagées (rectangulaire, elliptique, etc.).

D'autre part, comme indiqué précédemment, le contour de l'ouverture de l'alvéole est préférentiellement muni d'un joint (5), permettant d'assurer une étanchéité à la chambre d'incubation. Le joint peut être réalisé par exemple dans ou à partir de tout matériau souple, de préférence de latex, de caoutchouc synthétique ou de silicone. En outre, le joint peut être de forme plane ou torique. Il peut présenter un diamètre ou une épaisseur variable, typiquement comprise entre 0,5 et 5 mm.

Les orifices (4) prévus dans le fond de l'alvéole ont de préférence un diamètre faible, puisqu'ils sont destinés essentiellement à assurer la circulation de liquides et/ou gaz. Typiquement, leur diamètre est compris entre 0,1 et 3 mm, de préférence entre 0,3 et 2 mm, plus préférentiellement entre 0,5 et 2 mm. Pour assurer une meilleure circulation des fluides dans la chambre d'incubation, et notamment afin de réaliser un balayage, les orifices sont avantageusement disposés de part et d'autre de l'alvéole, c'est-à-dire typiquement diamétralement opposés. Ainsi, lorsque la chambre d'incubation est formée par mise en place de la lame, les orifices se trouvent disposés de part et d'autre de la zone réactive, et permettent de réaliser un balayage de celle-ci.

Dans un mode de mise en œuvre préféré du dispositif de l'invention, l'alvéole comprend deux orifices diamétralement opposés, l'un pour l'entrée des fluides, l'autre pour la sortie des fluides.

Il est entendu que des orifices supplémentaires (par exemple 1 ou 2) peuvent être prévus, soit pour l'alimentation en liquide(s), soit pour le séchage ou l'alimentation en gaz, par exemple, soit encore pour améliorer le flux ou le balayage au sein de la chambre d'incubation. Ainsi, dans un mode de mise en oeuvre préféré du dispositif de l'invention, le fond de l'alvéole comprend trois

orifices : un orifice de sortie et deux orifices d'entrée, l'un destiné aux liquides et l'autre aux gaz, notamment à l'air de séchage. Plus préférentiellement, dans ce mode de réalisation, l'orifice de sortie est disposé d'un côté du fond de l'alvéole et les deux orifices d'entrée sont disposés sur le côté diamétralement opposé, typiquement proches l'un de l'autre (voir Figure 8A).

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, le dispositif comporte en outre des moyens pour disposer et/ou bloquer une lame de sérologie ou d'histologie de manière à ce que la zone réactive de la lame (6) se trouve en face de l'ouverture de l'alvéole à la surface du support, la lame et le support coopérant ainsi pour former une chambre d'incubation étanche.

Les moyens permettant de disposer et/ou bloquer la lame sur le support peuvent être constitués par exemple d'un lamage, d'un épaulement ou de picots. De tels moyens permettent de forcer une mise en place correcte de la lame de manière à ce que la zone réactive se trouve en face de l'ouverture de l'alvéole. Dans une réalisation préférée, un dégagement (13) est ménagé dans le support, à une extrémité de l'emplacement de la lame, pour en faciliter le dégagement par simple pression, et/ou un couvercle (7) mobile et articulé permet de bloquer la lame (appui et maintien), une fois en position.

Dans une variante particulière, les moyens pour disposer et/ou bloquer la lame comportent un cadre articulé (14), notamment à glissière et, éventuellement, des moyens de verrouillage. Le cadre articulé comporte avantageusement une articulation ou une charnière permettant la mise en place aisée et guidée de la lame (et ainsi l'ouverture et la fermeture de la chambre d'incubation), ainsi que, éventuellement, un couvercle (141). Les moyens de verrouillage peuvent comporter, par exemple, une molette (142) actionnant une came de verrouillage, ou encore un électroaimant.

Dans une autre variante de réalisation particulière, les moyens pour disposer et/ou bloquer la lame sont constitués par un couvercle (7) fixe muni d'un emplacement (71) permettant la mise en place de la lame (6), le bloc support de

l'alvéole étant mobile par rapport au dit couvercle. Dans ce cas, c'est le support de l'alvéole qui peut être mû dans la direction verticale de sorte à réaliser la fermeture de la chambre d'incubation lorsque la lame est en place. Dans cette variante, les lames sont avantageusement glissées dans un emplacement (71) (par exemple une rainure) ménagé dans le couvercle, et la montée du support ferme la chambre d'incubation (et place la zone réactive au contact de liquides antérieurement ou ultérieurement introduits dans celle-ci). De préférence, dans le dispositif de l'invention selon ce mode de réalisation, le support et le couvercle fixe sont liés par des moyens de guidage du mouvement du support et comporte avantageusement des moyens pour commander ce déplacement, par exemple électriques ou mécaniques. D'autre part, dans cette variante, le couvercle est avantageusement percé d'une ouverture (3) à l'aplomb de l'alvéole d'incubation, de sorte à permettre l'introduction de l'échantillon dans ledit alvéole avant la mise en place de la lame, le cas échéant. La figure 4 montre cette disposition en perspective cavalière.

15

Ainsi, un objet particulier de la présente invention concerne un dispositif d'incubation de lames de sérologie ou d'histologie présentant une zone réactive, caractérisé en ce qu'il comprend:

- un support solide (1) mobile ayant une surface plane sur sa face supérieure, dans lequel est aménagé au moins un alvéole (2) ouvert sur la surface du support, l'ouverture ayant une superficie supérieure à celle de la zone réactive de la lame et inférieure à celle de la surface de la lame, dans lequel le fond de l'alvéole comprend au moins deux orifices (4) permettant la circulation de fluide(s) dans l'alvéole et le contour de l'ouverture de l'alvéole est muni d'un moyen permettant d'assurer une étanchéité ;

25

- un couvercle fixe (7) muni d'un emplacement (71) permettant la mise en place de la lame, et d'une ouverture (3) ; et

- des moyens pour guider le déplacement essentiellement vertical du support (1) mobile vers le couvercle (7) fixe pour permettre de former une chambre d'incubation étanche entre l'alvéole et la lame, lorsque celle-ci est en place, la zone réactive de la lame étant contenue dans ladite chambre d'incubation.

30

Dans un mode de réalisation préféré, les moyens de guidage du mouvement vertical du support comprennent une charnière, de préférence constituée d'une lame d'acier, placée à une distance suffisante de la zone réactive de la lame lorsque celle-ci est en place pour assurer une pression essentiellement uniforme sur le joint de l'alvéole, typiquement de 5, 6, ou 7 cm au moins, 10 cm par exemple, et fixée à la fois au couvercle et au support de l'alvéole (voir Figure 8B). La montée du support, de l'ordre de 3 mm, peut être assurée manuellement, par exemple un levier à came, ou de manière mécanisée par moteur électrique ou un vérin.

10

Dans un mode de réalisation préféré, le dispositif de l'invention comporte en outre des moyens pour assurer une alimentation en fluide(s) de la chambre d'incubation. Ces moyens d'alimentation comprennent typiquement au moins un réservoir d'alimentation en fluide (8) relié à un premier orifice de l'alvéole, dit orifice d'entrée, par un système de tubulure pour l'introduction de fluide(s) dans l'alvéole, et un réservoir de récupération de fluide (9) relié à un deuxième orifice de l'alvéole, dit orifice de sortie, par un système de tubulure, pour l'élimination des fluides, lesdits systèmes étant connectés à une ou plusieurs pompes (10, 11).

Dans une variante de mise en œuvre, on utilise une pompe unique (de préférence aspirante) pour commander l'entrée et la sortie des fluides.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise la mise en pression des réservoirs pour mouvoir les fluides, chaque canal d'alimentation est alors muni non seulement d'une vanne mais aussi d'un élément de réglage du débit tel qu'un pointeau.

Avantageusement, le dispositif comporte plusieurs (par ex. 2 à 6) réservoirs d'alimentation en fluides (8) reliés à l'orifice d'entrée, chaque réservoir étant connecté à une vanne (12). La présence de plusieurs réservoirs d'alimentation permet l'introduction de différents réactifs (liquides, gaz) dans la chambre d'incubation, selon des cinétiques, doses et/ou programmes adaptés. La présence de vannes permet de réguler individuellement l'alimentation en chacun des fluides (ou à partir de chacun des réservoirs d'alimentation présents).

Dans une variante préférée, une pompe de type péristaltique est mise en oeuvre, de préférence à mouvement réversible, assurant la mise place successive des liquides par aspiration, chaque liquide étant sous le contrôle d'une vanne. Le débit de la pompe peut varier par exemple de 0,1 à 10 ml/min. Une pompe de type
5 seringue peut être utilisée, avec les mêmes débits.

D'autre part, dans une variante particulière de l'invention, le dispositif comporte en outre une pompe supplémentaire (11) pour le séchage de la lame ou pour le nettoyage du dispositif. Il s'agit avantageusement d'une pompe à air non volumétrique, avec un débit compris par exemple entre 100 et 3000 ml/min. Il est
10 entendu que ces chiffres sont fournis à titre indicatif, et que certaines réalisations peuvent sortir de ces limites et être adaptées par l'homme du métier.

Les deux pompes peuvent être connectées à la même tubulure de sortie, chacune contrôlée par une vanne. Dans le cas d'une pompe péristaltique la vanne n'est pas nécessaire. La pompe à air pour le séchage peut être soit aspirante,
15 auquel cas elle est connectée du même côté que la pompe d'aspiration des liquides, ou du type soufflant, auquel cas elle est connectée de l'autre côté (ainsi qu'il est montré sur la figure 5).

Les vannes utilisées sont avantageusement commandées électriquement. Selon les modes de réalisation, 3 à 6 vannes contrôlent l'arrivée des réactifs, 0 à 3
20 vannes contrôlent les pompes d'aspiration. Dans une réalisation préférée, une des vannes est utilisée pour assurer la mise à la pression atmosphérique, facilitant l'ouverture et la fermeture de la chambre d'incubation.

Dans un mode particulier de l'invention le circuit d'aspiration peut être
25 commuté directement vers l'un ou l'autre réservoir d'alimentation en fluides (8) par une vanne trois voies (Figure 9). La présence de ce circuit auxiliaire permet l'élimination des bulles qui peuvent s'introduire dans le système lors d'un changement ou remplissage de réservoir.

30 Le dispositif peut être limité à une seule lame mais, dans une réalisation avantageuse, plusieurs lames sont incubées en parallèle. Dans ce cas, plusieurs

alvéoles sont avantageusement prévus dans le support (ou plusieurs supports sont utilisés), chaque alvéole comprenant son jeu d'électrovannes (12). Dans une réalisation particulière les électrovannes sont commandées de façon synchrone et une pompe préréaltique multicanaux assure le transfert des réactifs de manière
5 simultanée dans les différents alvéoles. Un contact auxiliaire peut être prévu pour empêcher l'ouverture des vannes sur un alvéole non utilisé.

Ainsi, un objet particulier de l'invention réside dans un dispositif dans lequel le support comporte une pluralité d'alvéoles tels que définis précédemment, permettant l'incubation en parallèle de plusieurs lames de sérologie ou d'histologie.
10 Typiquement, chaque alvéole est muni de moyens d'alimentation en fluides et les unités alvéole-système d'alimentation ainsi constituées sont agencées pour fonctionner en parallèle, en utilisant les mêmes fluides, selon des séquences synchrones ou décalées.

15 Dans un mode préféré de l'invention la pompe de transfert de liquide est aspirante, la pompe à air est soufflante et connectée à l'orifice d'entrée de l'alvéole, de sorte que les fluides circulent toujours dans le même sens et s'évacuent dans un réceptacle (9) unique.

Dans un mode particulier de mise en œuvre, le dispositif de l'invention
20 comporte en outre des moyens d'alimentation automatique de lames et, éventuellement, un lecteur d'identifiant de lames. La lame peut être identifiée par un code à barre ou, de façon préférentielle, par une étiquette électronique.

Dans un autre mode particulier de mise en œuvre, qui peut être combiné
25 avec l'un quelconque des précédents, le dispositif de l'invention comporte en outre des moyens de transfert de lame vers un dispositif de lecture de signal, en particulier un lecteur optique en vue de réaliser les observations et mesures des caractéristiques biologiques des échantillons. Avantageusement, le dispositif de lecture de signal est intégré dans le support et/ou le couvercle du dispositif
30 d'incubation selon l'invention.

Dans un mode particulier de l'invention le matériau du support est transparent et le fond de l'alvéole est poli de sorte que le dispositif optique d'observation peut être intégré dans le dispositif d'incubation. A titre d'exemple on peut munir le dispositif d'incubation de la figure 4 d'une optique de détection
5 de fluorescence avec une diode électroluminescente intégrée dans le support et un objectif rétractable venant en contact avec la lame. De tels dispositifs optiques sont grandement facilités par la disposition de fibre optique pour résoudre les problèmes d'encombrement ainsi que l'homme de l'art sait le faire.

10 Dans un mode particulier de l'invention, le fond de l'alvéole au droit de la zone réactive de la lame est constitué du côté plan d'une lentille plan-convexe, première lentille d'un objectif de collecte de la lumière émise par l'échantillon. Selon ce mode de réalisation, pour les mesures de fluorescence, la source excitatrice est placée au dessus de la lame.

15 Les dispositifs selon l'invention sont adaptés à tout type de lame de sérologie ou d'histologie. Dans ce contexte, au sens de la présente demande, on entend par "lame" tout élément rigide porte-objet pouvant être utilisé pour immobiliser un dépôt biologique, délimitant ainsi une zone réactive. Il peut s'agir
20 par exemple d'une lamelle solide, d'une membrane, d'un filtre, etc. La lame peut être réalisée en (ou à base de) tout matériau connu et conventionnel, comme du plastique, verre, nylon, céramique, métal, des polymères biologiques, de la silice, etc. Des lames préférées sont des lames porte-objet de microscopie en verre. Leurs dimensions sont généralement standard, soit environ 25mm x 75mm. Dans un
25 mode de réalisation préféré, les lames sont munies d'un détrompeur, par exemple sous la forme d'une encoche dans un coin.

Les pipeteurs automatiques du commerce, tels que ceux fabriqués par Cavo, Hamilton, ou Gilson, peuvent être utilisés pour introduire l'échantillon
30 (version sérologie) ou l'anticorps monoclonal (version histologie) à la dilution convenable.

Différents mode de réalisation et d'utilisation de l'invention sont décrits dans les exemples et dans les figures annexées, dans lesquelles:

5 La Figure 1 est une vue de dessus de l'alvéole d'incubation en version sérologie. Plan coté. (1) : support creusé de l'alvéole d'incubation (2) et d'une empreinte de lame. (4) : orifices d'entrée et de sortie des liquides et des gaz. (5) : joint d'étanchéité. (13) : dégagement de la lame .

10 La Figure 2 est une vue de dessus de l'alvéole d'incubation en version histologie. Plan coté.

 La Figure 3 représente un bloc portant l'alvéole d'incubation selon l'invention à support fixe et couvercle mobile. (1) : support creusé de l'alvéole
15 d'incubation (2) et d'une empreinte de lame. (4) : orifices d'entrée et de sortie des liquides et des gaz. (5) : joint d'étanchéité. (6) : lame, représentée hors place. (7) : couvercle, représenté sans les articulations. (13) : dégagement de la lame.

 La Figure 4 représente un dispositif selon l'invention à couvercle (7) fixe et
20 support d'alvéole (1) mobile, pourvu de moyens de guidage et de mise en place de la lame; (3) ouverture du couvercle, permettant l'introduction de l'échantillon dans l'alvéole. La mécanique de montée et descente du bloc n'est pas représentée.

 La Figure 5 représente une coupe schématique de principe des circulations
25 en version sérologie. Le bloc des électrovannes (12) est constitué d'un socle de métacrylate percé de canalisations fines et sur lequel sont boulonnées les vannes. Le bloc est lui-même boulonné sur le support d'alvéole. Les tubulures sont représentées par des lignes pointillées. Le circuit électrique n'est pas représenté.

La Figure 6 est un schéma de principe des circulations en version histologie. Il n'y a pas de dispositif de séchage, considéré comme facultatif en histologie.

5 La Figure 7 représente une disposition d'un incubateur à quatre lames selon l'invention, vu de dessus à l'échelle 1/2- Les dispositifs de verrouillage des lames sont représentés en gris. Chaque dispositif consiste en un cadre (métallique) articulé (14) portant un couvercle transparent (141), ainsi qu'une molette (142) actionnant la came de verrouillage (non figurée). Les grands cercles sont les
10 emplacements des flacons de tampon et d'eau, les petits cercles hachurés sont les emplacements des réactifs à utilisation restreinte, tels que les agents colorés.

La Figure 8A représente un schéma d'alvéole à trois orifices, deux pour l'entrée des fluides et un pour leur sortie ; la Figure 8B représente un dispositif
15 selon l'invention pourvu de moyens de guidage et de mise en place de la lame (6), constitués d'une charnière comprenant une lame d'acier (clinquant) fixée au couvercle (7) et au support de l'alvéole (1). Sur cette représentation, la montée du support est assurée manuellement par un levier à came.

20 La Figure 9 représente un schéma de montage hydraulique (cablage fluide) d'un dispositif de l'invention comprenant des vannes trois voies (symbole Y) permettant de commuter un circuit d'aspiration directement vers l'un ou l'autre réservoirs d'alimentation en liquides (8) par un circuit auxiliaire.

25 La figure 10 représente une disposition d'un incubateur à quatre lames selon l'invention, vue en perspective cavalière. Les unités d'incubation répondent aux schémas de principe de la figure 8.

30 Comme illustré sur les figures, l'invention peut être mise en œuvre pour l'analyse de lames de sérologie. Dans le mode sérologique, la lame porte une série de dépôts biologiques ("spots"), par exemple d'agents infectieux, pathogènes,

d'autoantigènes ou d'allergènes. Les dépôts sont soigneusement repérés, ce repérage constituant un code d'identification. L'échantillon liquide à tester est un sérum de patient, généralement dilué dans un tampon approprié.

Les réactifs mis en œuvre sont :

- 5 1) Les agents de révélation des anticorps du patient éventuellement fixés sur la lame et, d'une manière préférentielle, des anticorps d'origine animale couplés à des molécules marqueurs, par exemple fluorescentes. Les anticorps d'origine animale (chèvre, souris, rat, lapin) sont préférentiellement de deux types: les uns reconnaissent les immunoglobuline de type M, les autres les
10 immunoglobulines de type G. Chaque type d'anticorps est couplé à un marqueur spécifique. Par exemple, les premiers sont couplés à la fluoresceine et les seconds à la rhodamine. Il est entendu que d'autres combinaisons de colorants et/ou marqueurs sont possibles, telles que les fluorochromes Alexa Fluor 488 et Alexa Fluor 594, pourvu que les spectres d'excitation ou d'émission diffèrent. De tels
15 colorants et/ou marqueurs peuvent être trouvés dans le commerce, par exemple auprès de Sigma (Saint-Louis, Mo, USA), Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) ou FluoProbes, y compris sous forme conjuguée aux anticorps anti IgG et anti IgM. Dans l'invention ils sont utilisés de préférence en mélanges dilués de manière à réaliser un marquage rapide et spécifique, selon les procédures connues
20 de l'homme de l'art.

2) Les solutions de rinçage qui sont utilisées, solutions salines légèrement détergentes selon des compositions connues de l'homme de l'art, pour rincer les réactifs en contact avec la lame, et solutions plus astringentes et eau distillée pour rincer l'appareil.

25

Les incubations peuvent être effectuées à température du laboratoire, ou à 37°C si un effet accélérateur est recherché. Elles procèdent par phases successives: la première étape est la mise en place dans l'alvéole (2) ou dans la chambre d'incubation de l'échantillon liquide à tester, généralement entre 10 et 100 µl.
30 L'échantillon peut être introduit de manière automatique au moyen du système de pompage ou, dans un mode préféré, par pipetage dans l'alvéole ouvert, avant

l'application de la lame. Ensuite, la lame (6) est mise en place, assurant la mise en contact de la zone réactive avec l'échantillon liquide à tester. La lame est appliquée sur le contour de l'alvéole de sorte à réaliser une étanchéité. Après un temps d'incubation approprié, le dispositif rince la lame au moyen d'une solution de rinçage, puis amène les réactifs de révélation marqués (e.g., les conjugués anticorps fluorescents). A l'issue d'une nouvelle incubation, la chambre d'incubation est rincée à nouveau. Dans un mode préféré, la dernière opération est un séchage par balayage d'air. Au cours du processus automatique d'incubation, les réactifs sont donc successivement introduits par pompage et entrent en contact avec la zone réactive de la lame, avec des temps de pause permettant le couplage réaction-diffusion. A la fin du processus la lame est ou non séchée par un courant gazeux.

Pour assurer une grande sensibilité, chaque réaction doit être aussi complète que possible, à l'exception de la première qui peut être "contrôlée par la cinétique" pour mieux refléter les différences d'un patient à un autre. L'invention permet en outre une grande spécificité, c'est-à-dire notamment l'absence d'artefacts dus à la persistance du réactif précèdent dans l'incubation suivante.

Dans un mode préféré, plusieurs unités d'incubation, alvéole-porte-lame-système de pompage, sont associées pour fonctionner en parallèle selon des séquences synchrones ou décalées, en utilisant des réservoirs de réactifs communs.

L'invention peut également être mise en œuvre pour l'analyse de lames d'histologie. Dans le mode histologique la lame porte un échantillon de tissu d'un patient, qui peut se présenter sous forme d'une coupe congelée et séchée ou d'une coupe déparaffinée, par exemple. Les réactifs mis en œuvre dans ce mode de réalisation sont :

1) Le ou les anticorps spécifiques reconnaissant les éléments d'intérêt sur la coupe échantillon. Ces anticorps sont de préférence monoclonaux, ils reconnaissent soit des antigènes de différenciation, tel que la cytokératine, soit des antigènes tumoraux, comme l'antigène carcinoembryonnaire. Ils peuvent être

directement marqués ou révélés par des anticorps secondaires eux-mêmes marqués, soit par des molécules fluorescentes, soit par des enzymes.

2) Les solutions de rinçage utilisées, solutions salines légèrement détergentes selon des compositions connues de l'homme de l'art, pour rincer les réactifs en contact avec la lame, et solutions plus astringentes et eau distillée pour rincer l'appareil.

Les incubations peuvent être effectuées à température du laboratoire, ou à 37°C si un effet accélérateur est recherché. Elles procèdent par phases successives: la première étape est la mise en place de l'anticorps spécifique, qui peut être un anticorps monoclonal convenablement dilué selon les règles connues de l'homme de l'art. L'anticorps peut être introduit de manière automatique au moyen du système de pompage, ou dans un mode préféré par pipetage dans l'alvéole ouvert, avant l'application de la lame. Plusieurs anticorps peuvent être successivement mis en contact avec lame, au moyen de l'incubateur, pourvu qu'en fin les marquages se distinguent les uns des autres. L'homme de l'art n'aura aucune peine à programmer la séquence adéquate pour réaliser les marquages qu'il aura choisis. Dans un mode particulier, un séchage par balayage d'air est effectué pour nettoyer l'appareil, après retrait de la lame.

20

Dans un mode préféré, plusieurs unités d'incubation, alvéole-porte-lame-système de pompage, sont associées pour fonctionner en parallèle selon des séquences synchrones ou décalées, en utilisant des réservoirs de réactifs communs.

25 D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples de mode d'utilisation qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Exemple 1 - Description d'une incubation de sérologie

30

Ce mode de mise en œuvre est décrit en relation avec la Figure n° 5.

Hors cellule, le sérum est chauffé 30 minutes à 57°C (décomplémentation) puis conservé à 4°C.

Etape 1- Le sérum est dilué 1/100 dans PBS-lait (NaCl 0.15 M, phosphate pH 7.0; 0.01 M, 50 ml + 1.5 g de lait).

- 5 Etape 2- 40 µl d'échantillon (sérum dilué) sont introduits dans la chambre ouverte. La lame test (Inodiag) est placée au dessus, les spots en contacts avec l'échantillon. La cellule (chambre d'incubation) est fermée et l'incubation est poursuivie pendant 20 minutes.

- 10 Etape 3- L'électrovanne « tampon » est alors ouverte et la pompe d'aspiration (10) mise en action. Le rinçage est effectué par 100 µl de tampon PBS contenant du tween 20 0.05%, pendant une période de 30 secondes environ. Cette opération est effectuée trois fois en suivant.

- 15 Etape 4- L'électrovanne « anti IgM+IgG » est ensuite ouverte et la pompe d'aspiration (10) mise en action. Ceci permet l'introduction dans la chambre d'incubation d'un mélange d'anticorps anti IgG et anti IgM (80µl, dilué dans PBS). L'incubation est poursuivie pendant 10 minutes environ. Ce réactif est fluorescent. Ensuite, des rinçages identiques à l'étape précédente sont réalisés.

Etape 5- L'électrovanne "eau" est ouverte et la pompe d'aspiration (10) mise en action pendant 30 secondes environ.

- 20 Etape 6- Enfin l'électrovanne liée à la pompe à air soufflante (11) est ouverte, ainsi que l'électrovanne directement liée au réservoir de sortie (9). La pompe à air (11) est actionnée pendant 20 secondes, pour sécher la lame.

Exemple 2 - Description d'une incubation histologique

25

Ce mode de mise en œuvre est décrit plus particulièrement en relation avec la Figure n° 6.

Hors cellule, la coupe est déparaffinée, réhydratée et pré-traitée selon les règles d'immunomarquage connues de l'homme de l'art.

Etape 1- L'échantillon (100 µl d'anticorps primaire (ref.: 10032.1, clone: B56, Histopathologie, Pécs, Hongrie) dilué au 1/100) est introduit dans la chambre ouverte.

5 Etape 2- La lame (6) porte-objet (coupe de tissu d'une épaisseur a 4 µm, ganglion lymphatique humain) est placée au dessus, la coupe en contacts avec l'anticorps dilué. La cellule (chambre d'incubation) est fermée et l'incubation est poursuivie pendant 20 minutes.

10 Etape 3- L'électrovanne « tampon » est ouverte et la pompe d'aspiration (10) est mise en action. Rinçage par 100 µl de tampon, attente 3 minutes. Cette opération est effectuée trois fois en suivant.

Etape 4- L'électrovanne « Réactif de détection » est ensuite ouverte et la pompe d'aspiration (10) mise en action. Ceci permet l'introduction dans la chambre d'incubation du réactif de détection (100 µl, polymère conjugué à l'enzyme peroxydase). Incubation 20 minutes.

15 Etape 5- Ensuite, des rinçages identiques à l'étape précédente sont réalisés.

Etape 6- L'électrovanne « substrat chromogène » est ensuite ouverte et la pompe d'aspiration (10) mise en action. Ceci permet l'introduction dans la chambre d'incubation du réactif de révélation d'un mélange de diamino-benzidine et d'eau oxygénée (100 µl). Incubation 20 minutes.

20 Etape 7- L'électrovanne « eau » est ouverte et la pompe d'aspiration (10) mise en marche. Apport de l'eau distillée pour arrêter l'action enzymatique.

Revendications

1. Dispositif d'incubation de lames de sérologie ou d'histologie présentant une zone réactive, caractérisé en ce que:

- 5 - il comprend un support solide (1) ayant une surface plane sur sa face supérieure, dans lequel est aménagé au moins un alvéole (2) ouvert sur la surface du support, l'ouverture ayant une superficie supérieure à celle de la zone réactive de la lame et inférieure à celle de la surface de la lame,
- Le fond de l'alvéole comprend au moins deux orifices (4) permettant la
- 10 circulation de fluide(s) dans l'alvéole,
- le contour de l'ouverture de l'alvéole est muni d'un moyen permettant d'assurer une étanchéité ; et
- le dispositif comporte en outre des moyens pour disposer et/ou bloquer une lame (6) de sérologie ou d'histologie de manière à ce que la zone réactive de
- 15 la lame se trouve en face de l'ouverture de l'alvéole à la surface du support, la lame et le support coopérant ainsi pour former une chambre d'incubation étanche.

2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens permettant de disposer et/ou bloquer la lame sur le support de manière à ce que la zone

20 réactive se trouve en face de l'ouverture de l'alvéole sont constitués d'un lamage, d'un épaulement ou de picots, et éventuellement d'un couvercle (7) mobile et articulé permettant de bloquer la lame une fois en position.

3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que un dégagement

25 (13) est ménagé dans le support, à une extrémité de l'emplacement de la lame, pour faciliter le dégagement de la lame par simple pression.

4. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens pour disposer et/ou bloquer la lame comportent un cadre articulé (14), notamment à

30 glissière et, éventuellement, des moyens de verouillage.

5. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les moyens pour disposer et/ou bloquer la lame sont constitués par un couvercle (7) fixe muni d'un emplacement (71) permettant la mise en place de la lame (6), le bloc support de l'alvéole étant mobile par rapport au dit couvercle.

5

6. Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que le support et le couvercle fixe sont liés par des moyens de guidage du mouvement du support et en ce qu'il comporte en outre des moyens pour commander ce déplacement, par exemple électriques ou mécaniques.

10

7. Dispositif selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que le couvercle fixe est percé d'une ouverture (3) à l'aplomb de l'alvéole d'incubation.

8. Dispositif d'incubation de lames de sérologie ou d'histologie présentant une zone réactive, caractérisé en ce qu'il comprend:

15

- un support solide (1) mobile ayant une surface plane sur sa face supérieure, dans lequel est aménagé au moins un alvéole (2) ouvert sur la surface du support, l'ouverture ayant une superficie supérieure à celle de la zone réactive de la lame et inférieure à celle de la surface de la lame, dans lequel le fond de l'alvéole comprend au moins deux orifices (4) permettant la circulation de fluide(s) dans l'alvéole et le contour de l'ouverture de l'alvéole est muni d'un moyen permettant d'assurer une étanchéité ;

20

- un couvercle fixe (7) muni d'un emplacement (71) permettant la mise en place de la lame, et d'une ouverture (3) ; et

25

- des moyens pour guider le déplacement essentiellement vertical du support (1) mobile vers le couvercle (7) fixe pour permettre de former une chambre d'incubation étanche entre l'alvéole et la lame, lorsque celle-ci est en place, la zone réactive de la lame étant contenue dans ladite chambre d'incubation.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'alvéole présente une forme circulaire ou allongée.

30

10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'alvéole possède un volume compris entre 5 et 500 μ l.
- 5 11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le moyen permettant d'assurer une étanchéité comprend un joint (5).
12. Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que le joint est fait d'un matériau souple, de préférence de latex, de caoutchouc synthétique ou de silicone,
10 et/ou en ce qu'il est de forme plane ou torique.
13. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le support solide est composé de matériau plastique, de métal et/ou de tout matériau rigide résistant aux solutions salines et à une température supérieure
15 ou égale à 37°C.
14. Dispositif selon la revendication 13, caractérisé en ce que le support solide est composé de polymétacrylate, de polyester, de polycarbonate, de nylon (delrin, rilsan) ou d'acier inoxydable, seuls ou en mélanges.
20
15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les orifices (4) de l'alvéole ont un diamètre compris entre 0,1 et 3 mm et/ou sont disposés de part et d'autre de l'alvéole, afin de réaliser un balayage.
- 25 16. Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'alvéole comprend deux orifices diamétralement opposés, l'un pour l'entrée des fluides, l'autre pour la sortie des fluides.
17. Dispositif selon la revendication 1 ou 15, caractérisé en ce que l'alvéole
30 comprend trois orifices, l'un pour la sortie des fluides, les deux autres, proches l'un de l'autre, pour l'entrée des liquides et des gaz respectivement.

18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens pour assurer une alimentation en fluide(s) de la chambre d'incubation.

5

19. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que les moyens d'alimentation comprennent au moins un réservoir d'alimentation en fluide (8) relié à un premier orifice de l'alvéole, dit orifice d'entrée, par un système de tubulure pour l'introduction de fluide(s) dans l'alvéole, et un réservoir de récupération de fluide (9) relié à un deuxième orifice de l'alvéole, dit orifice de sortie, par un système de tubulure, pour l'élimination des fluides, lesdits systèmes étant connectés à une ou plusieurs pompes (10, 11).

20. Dispositif selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comporte plusieurs réservoirs d'alimentation en fluides reliés à l'orifice d'entrée, chaque réservoir étant connecté à une vanne (12).

21. Dispositif selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce que les moyens d'alimentation comprennent une (ou des) vanne(s) trois voies permettant de commuter un circuit d'aspiration directement vers l'un ou l'autre réservoirs d'alimentation en liquides (8) par un circuit auxiliaire.

22. Dispositif caractérisé en ce que le support comporte une pluralité d'alvéoles tels que définis dans l'une quelconque des revendications précédentes.

25

23. Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que chaque alvéole est muni de moyens d'alimentation en fluide et en ce que les unités alvéole-système d'alimentation ainsi constituées sont agencées pour fonctionner en parallèle, en utilisant les même fluides, selon des séquences synchrones ou décalées.

30

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens d'alimentation automatique de lames et, éventuellement, un lecteur d'identifiant de lames.
- 5 25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens de transfert de lame vers un dispositif de lecture de signal.
- 10 26. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, caractérisé en ce qu'il comporte un dispositif de lecture de signal intégré dans le support et/ou le couvercle.
- 15 27. Procédé d'analyse sérologique comprenant l'incubation d'une lame de sérologie comprenant une zone réactive comportant une série de dépôts d'agents infectieux, pathogènes, allergènes ou autoantigènes avec un échantillon de sérum d'un patient, ou une dilution de celui-ci, puis la révélation des anticorps de l'échantillon fixés sur les dépôts au moyen de réactifs marqués, caractérisé en ce que l'incubation est réalisée dans un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 26.
- 20 28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'échantillon à tester est introduit dans un alvéole avant la mise en place de la lame, puis la lame est appliquée sur la surface du support de manière à former la chambre d'incubation étanche dans laquelle la zone réactive de la lame est au contact de l'échantillon.
- 25 29. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'échantillon à tester est pompé dans la chambre d'incubation formée par la lame mise en place sur l'alvéole.
- 30 30. Procédé d'analyse histologique comprenant l'incubation d'une lame d'histologie comprenant une zone réactive comportant un échantillon de tissu d'un patient avec une solution d'anticorps spécifiques, puis la révélation des anticorps de la solution

fixés sur l'échantillon au moyen de réactifs marqués, caractérisé en ce que l'incubation est réalisée dans un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 26.

- 5 31. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 26 pour l'analyse sérologique ou histologique.

32. Kit comprenant un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 26.

1/10

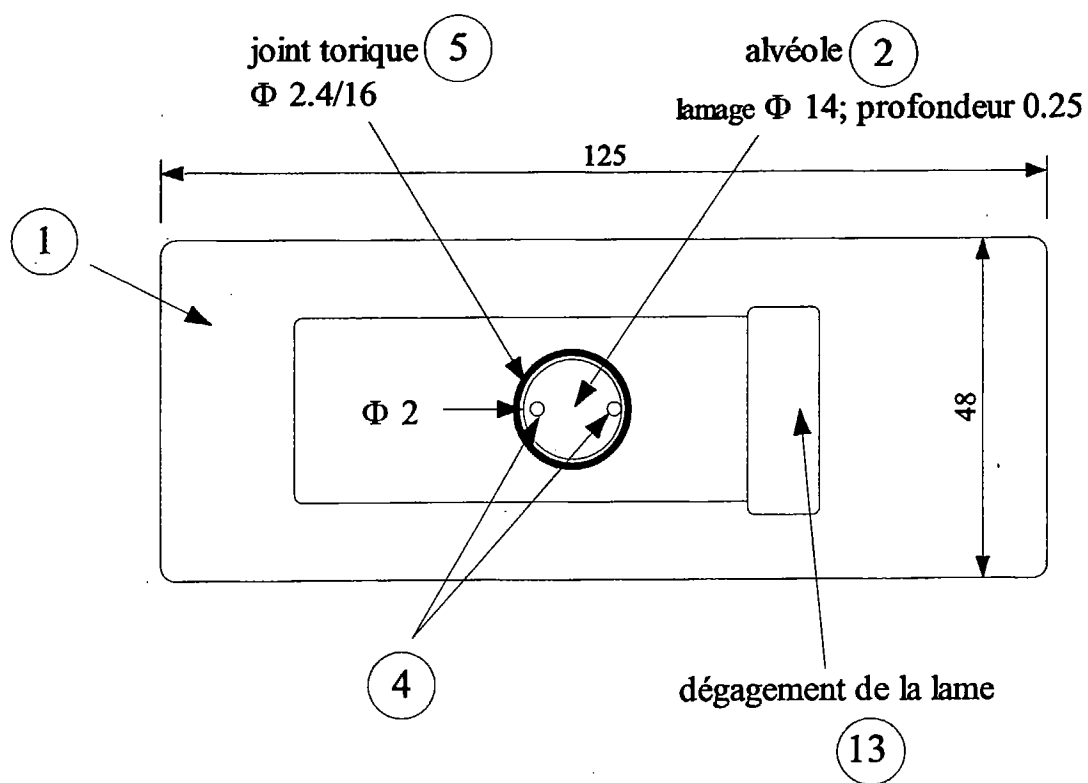


Figure 1

2/10

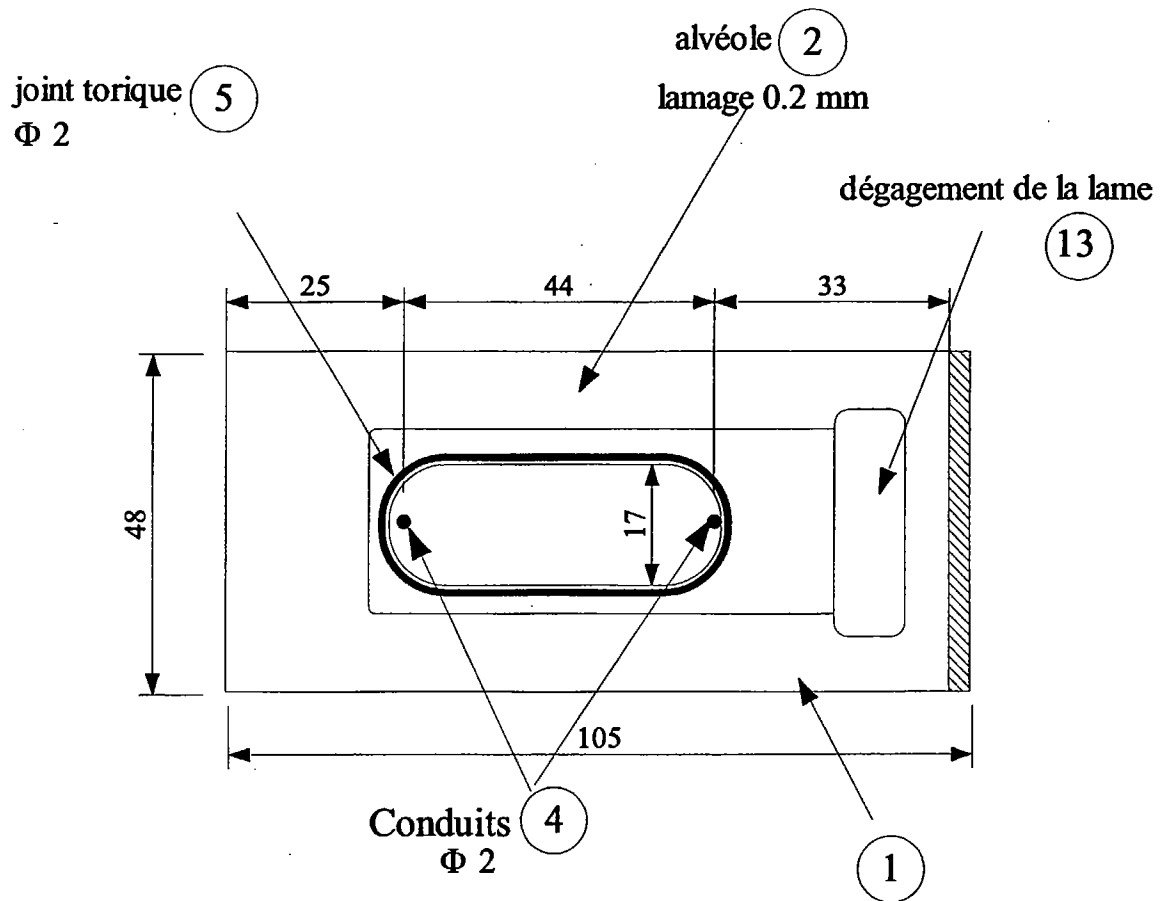


Figure 2

3/10

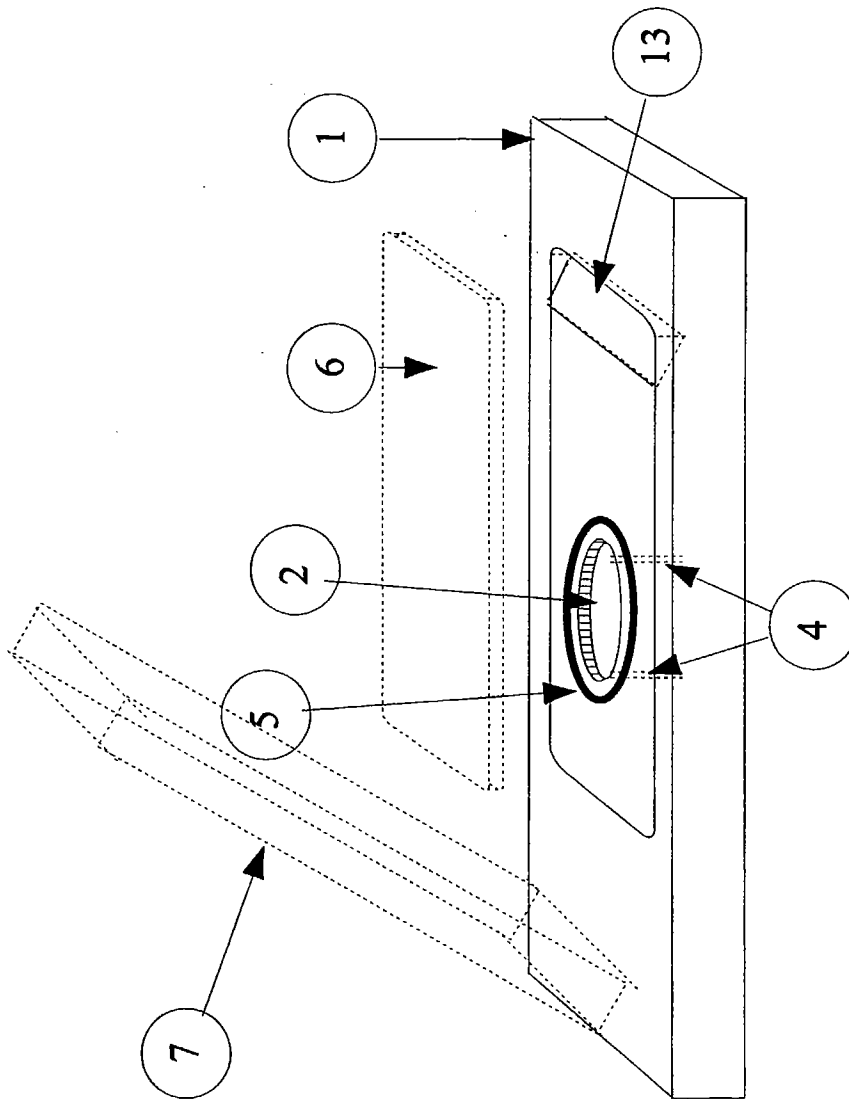


Figure 3

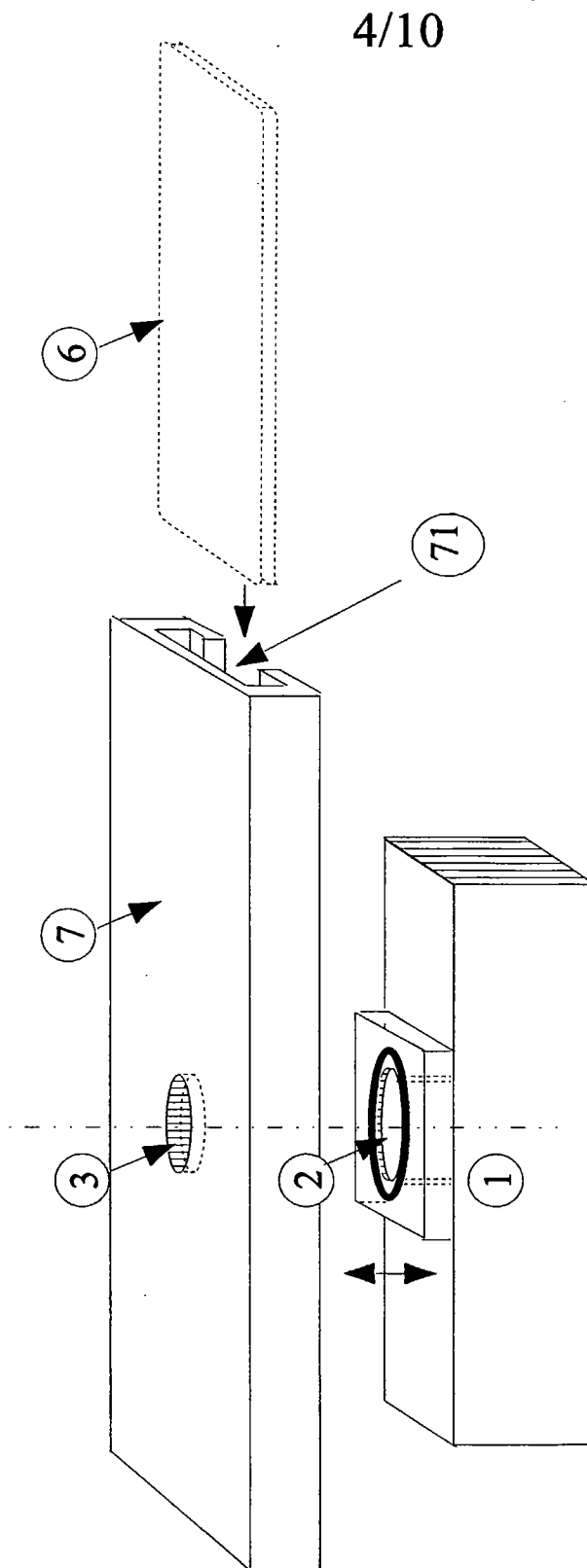


Figure 4

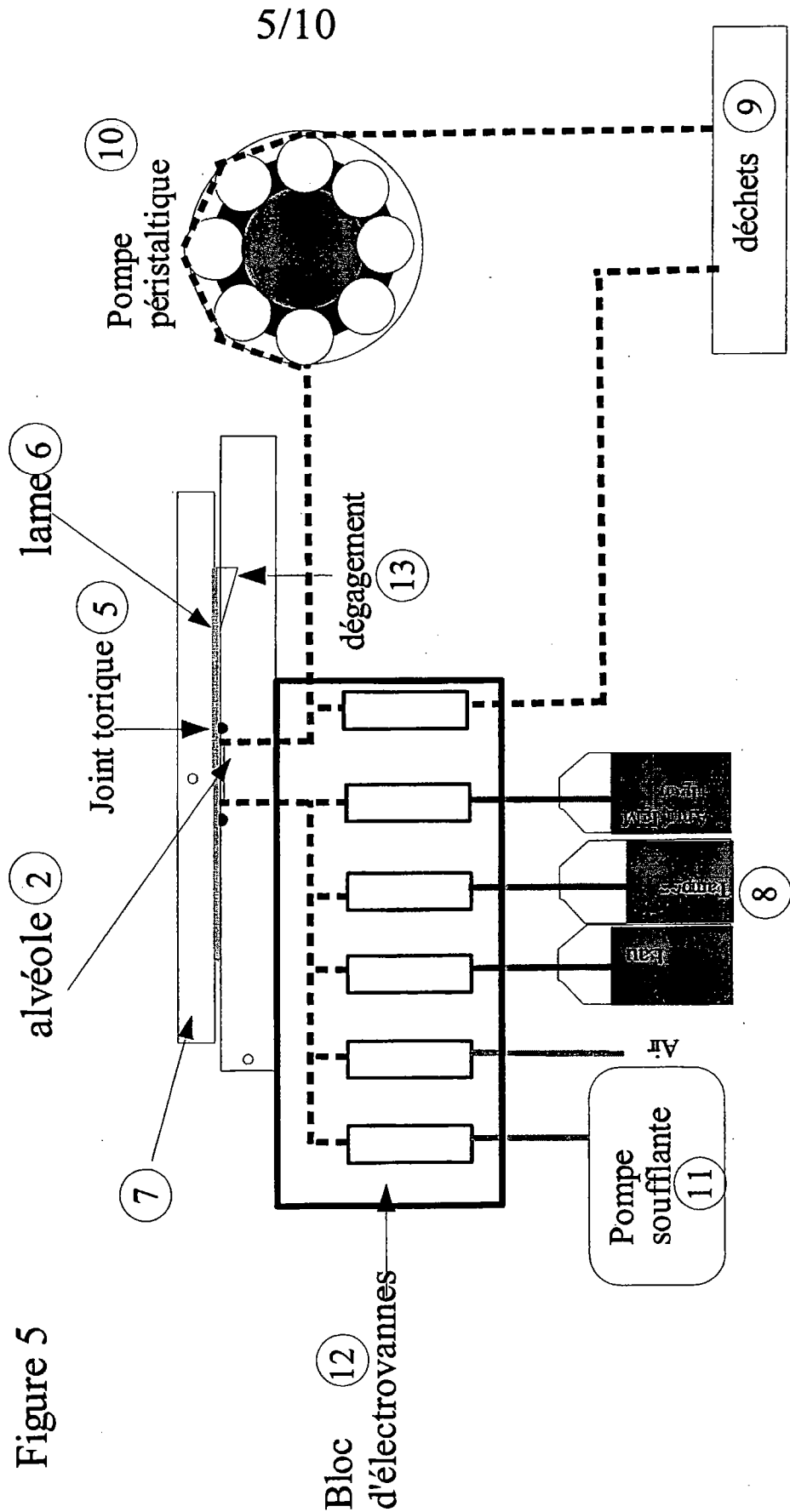
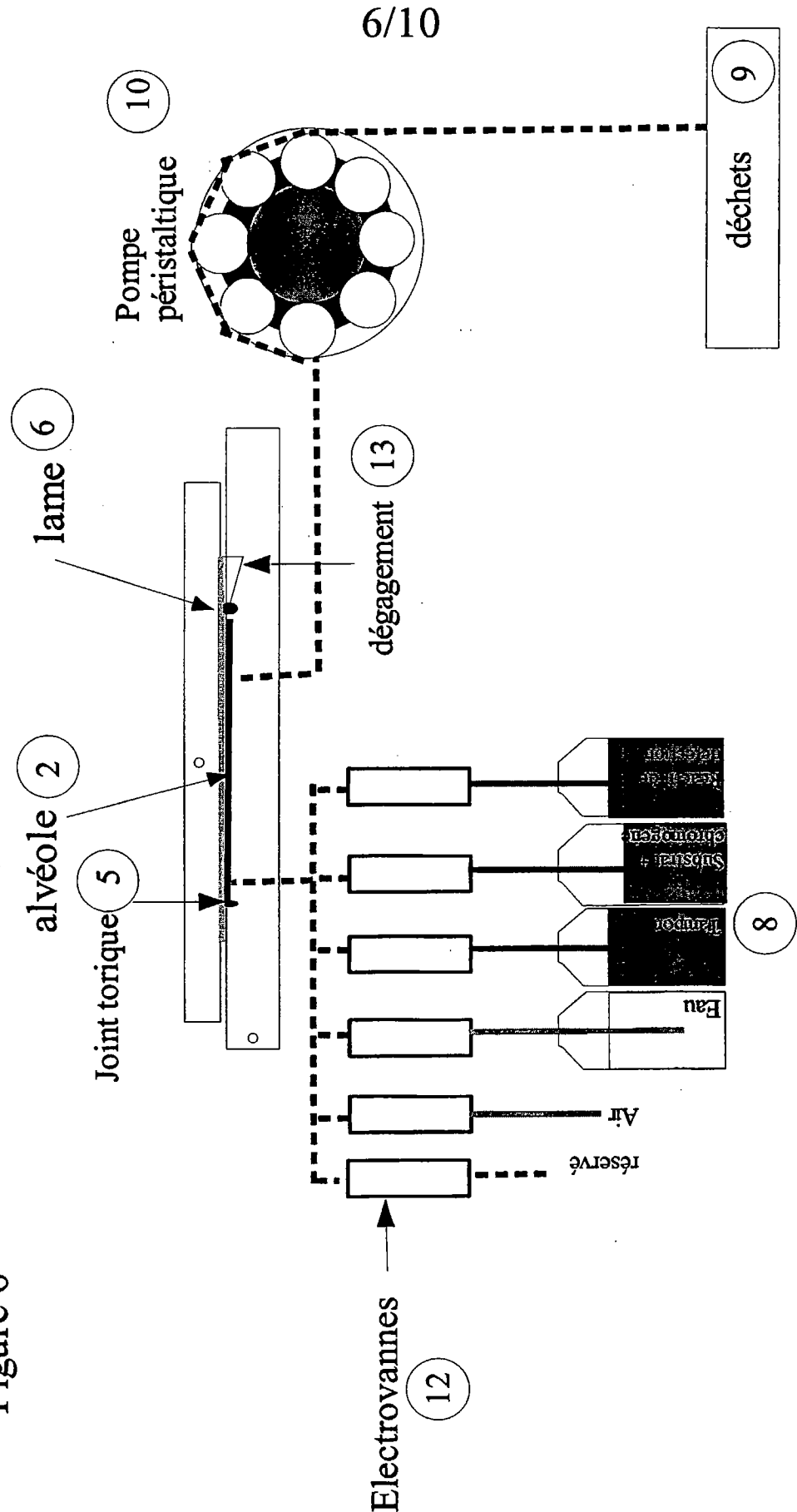
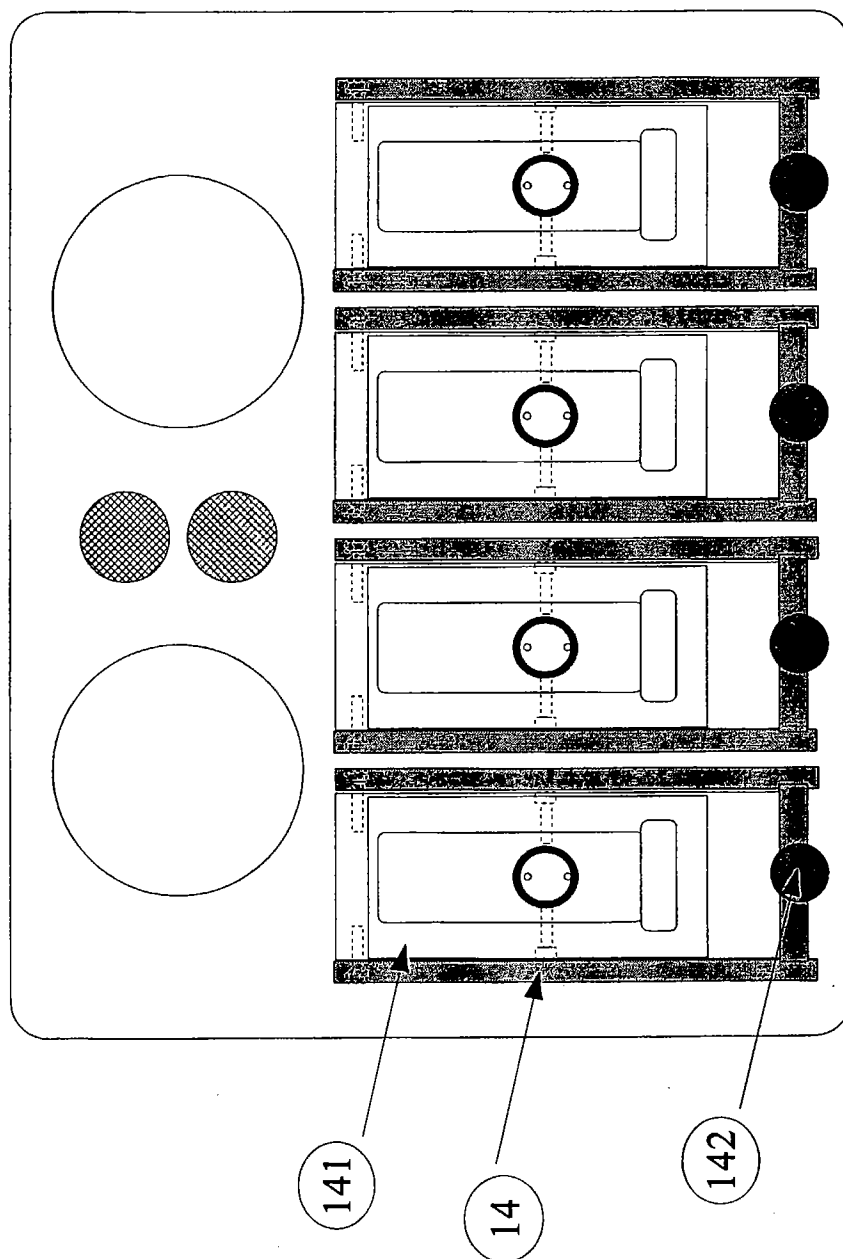


Figure 6

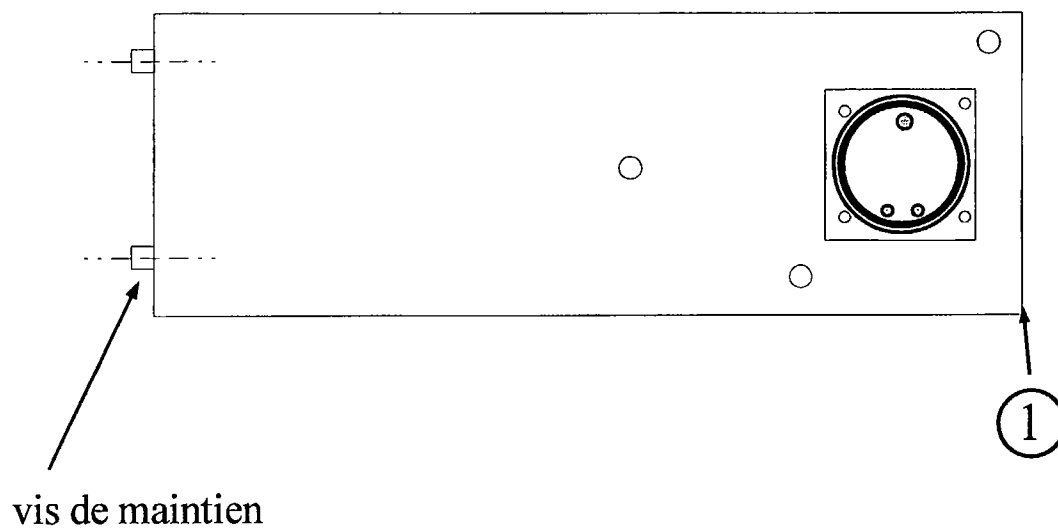
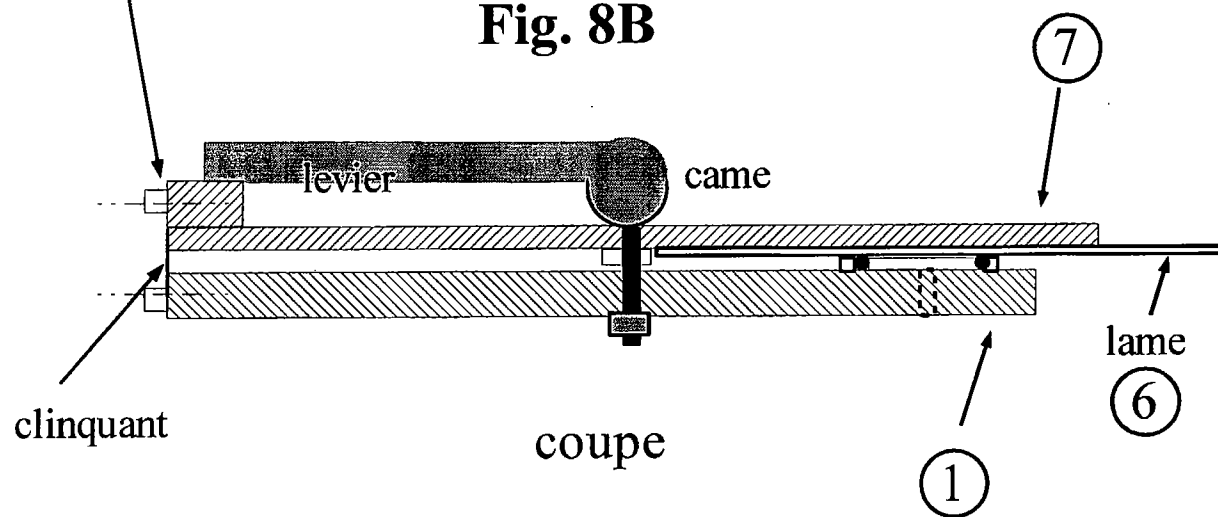


7/10

Figure 7

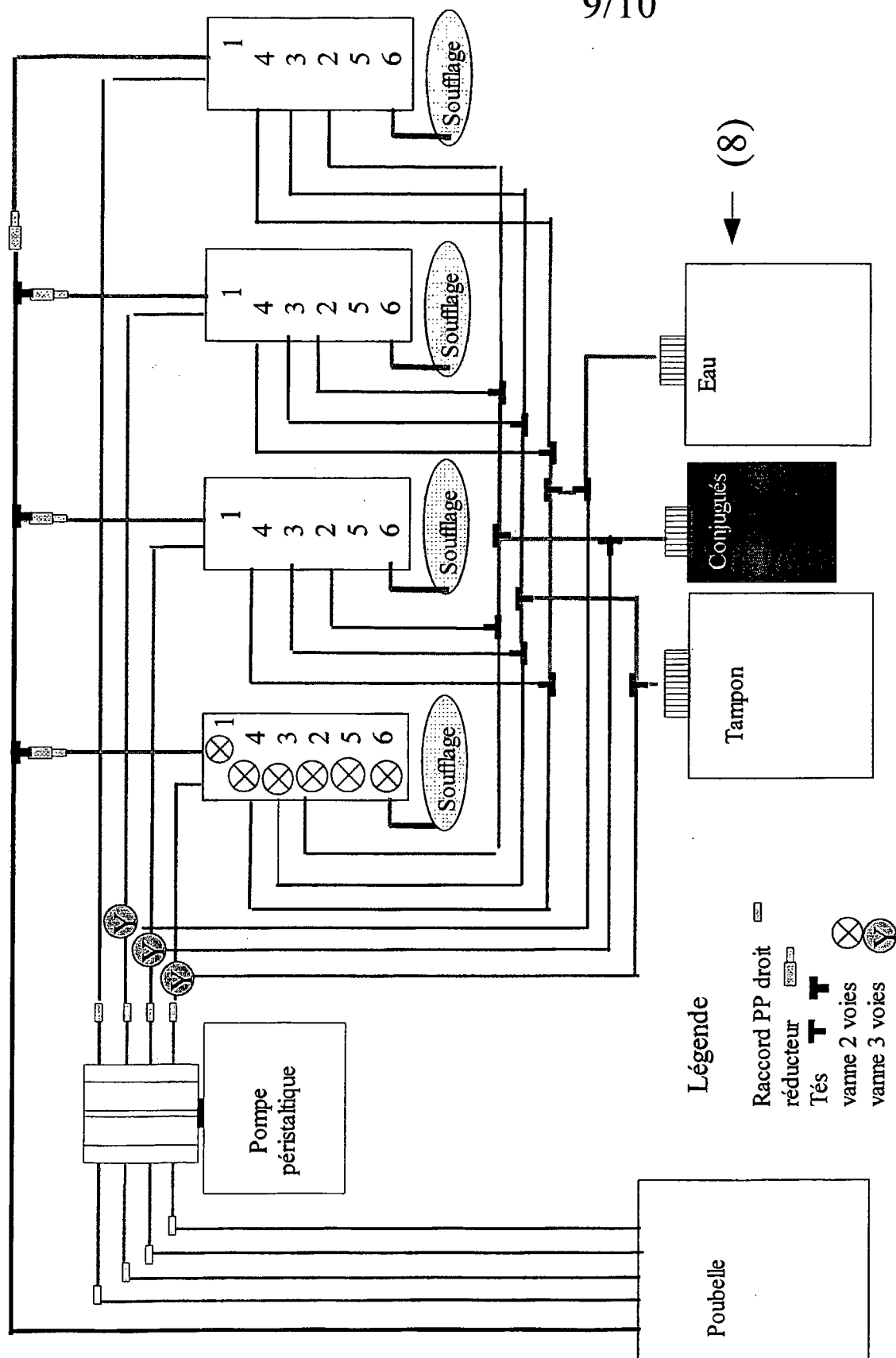


8/10

Fig. 8A**Fig. 8B****Figure 8**

9/10

Figure 9



10/10

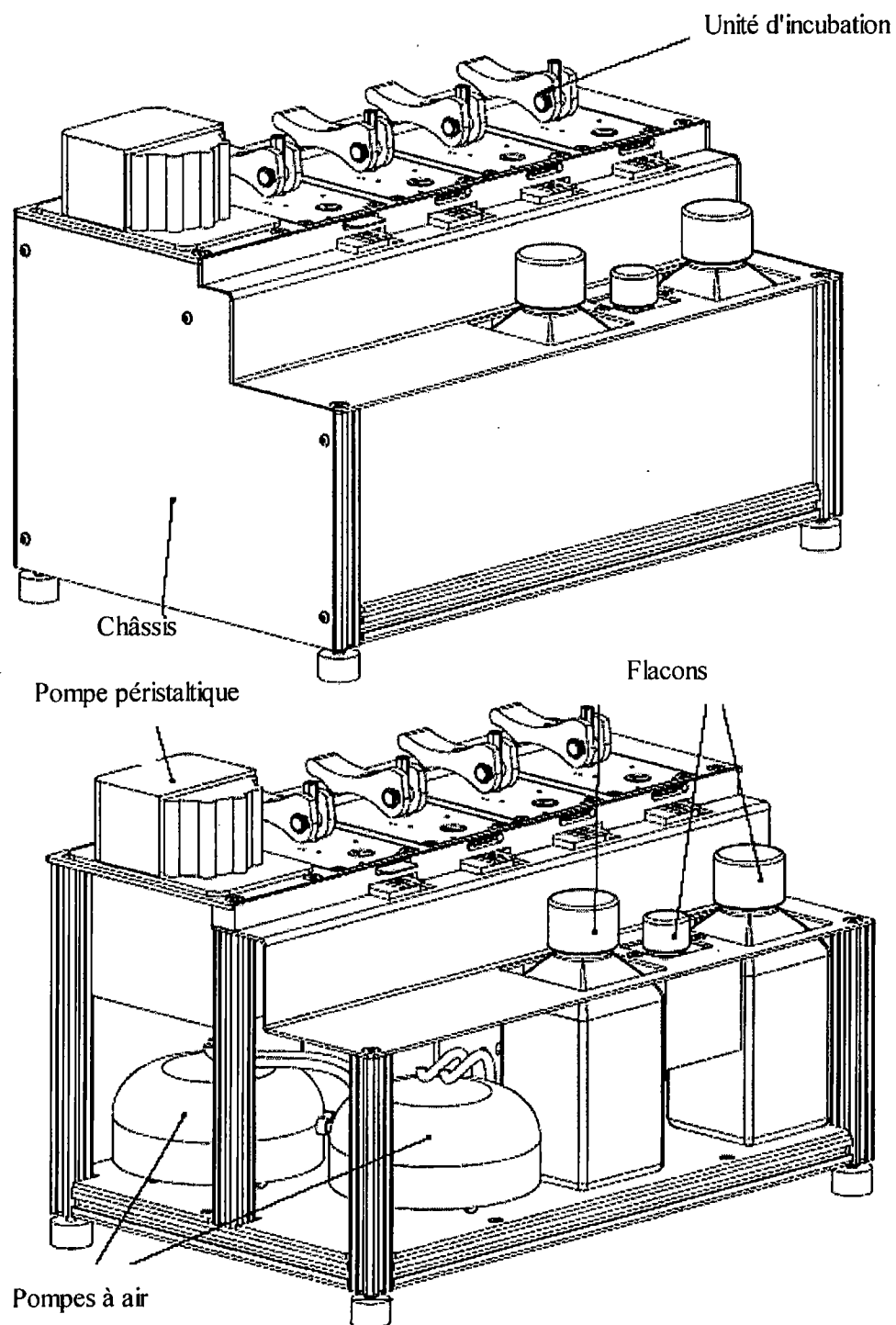


Figure 10